

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-40567

(43)公開日 平成9年(1997)2月10日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78			A 6 1 K 35/78	B
C 1 2 P 17/02			C 1 2 P 17/02	

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平7-191970

(22)出願日 平成7年(1995)7月27日

(71)出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(72)発明者 折谷 隆之

宮城県仙台市青葉区川平4丁目3の16

(72)発明者 杉山 長美

宮城県仙台市青葉区中山5丁目18-1-301

(72)発明者 三口 守公

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 北川 富造

(54)【発明の名称】 タキソールおよびタキサンテルペノイド類の製造方法

(57)【要約】

【目的】容易に栽培し、繁殖することができ、木本体を伐採することなく多量に採取することが可能である植物原料より、タキソールおよびタキサンテルペノイド類を得る。

【構成】日本産イチイを原料とすることを特徴とするタキソールおよびタキサンテルペノイドの製造方法。

【効果】本発明の方法は、イチイ植物体の生原料をも用いることができる。また、容易にカルスに誘導できるので組織培養によりタキソールの生産ができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】日本産イチイを原料とすることを特徴とするタキソールの製造方法。

【請求項2】日本産イチイを原料とすることを特徴とするタキサンテルペノイド類の製造方法。

【請求項3】日本産イチイが宮城県産であることを特徴とする請求項1記載のタキソールの製造方法。

【請求項4】日本産イチイが富山県産であることを特徴とする請求項2記載のタキソールの製造方法。

【請求項5】日本産イチイの葉、心材または皮を直接アルコール抽出し、ついでそのアルコール抽出液の濃縮液を酢酸エチルエステルで抽出し、ついで希アルカリ水溶液で洗浄し、粗抽出物を得ることを特徴とする請求項1記載のタキソールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タキソールの製造方法に関する。更に詳しくは、日本産イチイを原料とすることを特徴とするタキソールの製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】イチイ属樹木 (*Taxus L.*) は北半球に10種類が分布し、日本ではイチイ (オンコ) *Taxus cuspidata Sieb et Zucc.* と低木のキャラボク (*T. cuspidata var. nana Hort. ex Rehder*) と黄色の実を着けるキミノオンコ (*T. cuspidata f. luteobaccata*) が生育している。これまでは、日本産イチイ成分に関する研究は、高木のオンコを中心として行われてきた。1913年に発表された上田の報告が最初のものであり、その後、近藤、天野は飛騨産イチイ葉を原料としてアルカロイドを抽出し、これを欧州産アルカロイドと同一物質と推定し、「タキシン」と命名した。その後、1960年頃より京都大学グループ、東北大中西グループにより研究が行われ、「タキサン」骨格を有する数種のジテルベンが得られた。

【0003】一方、1971年に構造決定されたタキソールは北米産イチイ、太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮から得られ、その化学構造の特異性に加えて、有糸分裂の際に微小管を安定化し、その脱重合を抑えることから新しいタイプの抗癌剤として注目されてきた。特に、タキソールは白血病のみならず難治性卵巣癌などにも有効で、その治療スペクトルの幅が広いことを特徴とすることである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のごとくタキソールは、植物中の含量が少なく樹皮より僅か0.01%の収率で得られるのみである。そのため、合成へのアプローチが盛んである。

【0005】現在世界で二つのグループにより全合成がなされた (K.C.Nicolaou et al., *Nature*, 第367巻、第630頁、1994年、R.A.Holton et al., *J. Am. Chem.*

Soc., 第116巻、第1599頁、1994年) が、実用的な方法とは必ずしも言えない。

【0006】その他、前駆体の10-デアセチルバカチンIIIなどからタキソールの半合成も行われている (ザ ジャーナル オブ オーガニック ケミストリー 第56巻、第6939頁、1991年) および組織培養によるタキソールの生産方法としては特開平6-292588号、特開平6-296493号に開示がある。しかし、有効な市場への供給方法がないまま現在に至っている。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、日本産イチイ属の樹木の成分を検討する過程において、札幌市内のイチイ樹皮などからタキソールが得られることを見だし、更にその知見に基づき本発明を完成した。

【0008】すなわち本発明は、日本産イチイを原料とすることを特徴とするタキソールの製造方法および日本産イチイの葉、心材または皮を直接アルコールで抽出し、ついでそのアルコール抽出液の濃縮液を酢酸エチルエステルで抽出し、ついで希アルカリ水溶液で洗浄し、粗抽出物を得ることを特徴とするタキソールおよびタキサンテルペノイド類の製造方法である。

【0009】以下、本発明の製造方法を説明する。

【0010】イチイ樹木に含まれるタキソールなどのタキサン・テルペノイド類は、アルカリに不安定なエステル結合を持ちアルカリで加水分解される。しかし、イチイ樹木抽出物を酢酸エチルなどの低級脂肪酸エステル溶媒に溶かし、アルカリ (NaOHあるいはKOH水溶液) で洗浄するとタキサン・テルペノイド類を分解せずに分離操作を困難にする高含量で含まれるフェノール類をアルカリ塩として除くことができる。

【0011】フェノール類の除去に用いるアルカリ水溶液の濃度は、1%以上の高濃度では、エマルジョン化とフェノール塩の析出により抽出操作を困難なものとするが、1%以下の低濃度のアルカリの食塩飽和から半飽和の水溶液を用いる操作では、エマルジョン化とNa塩の析出 (放置時間を長くすると塩の析出を招く) を防ぎ容易に中性および塩基性混合物のタキサン・テルペノイド類を得ることができる。

【0012】従来、タキサン・アルカロイド類は、脂溶性の性質が強く、鉍酸水溶液での抽出操作が困難とされていた [J. Nat. Products, 56 (4) 514~520 (1993)] が、フェノール類を除いた抽出物をメタノールなどの低級アルコール類を5~10%濃度を含む鉍酸 (5~10%塩酸あるいは硫酸) 水溶液で抽出 (3回) で分離し、水層を合わせてアルカリ性として酢酸エチル抽出するとタキサン・アルカロイド類が得られる。

【0013】このようにしてアルカロイド類を除いた酢酸エチル層を乾燥、濃縮するとタキソールを含む中性の

タキサン・テルペノイド類が分離される。後者をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー（TLC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にかけると容易にタキソールおよびタキサン・テルペノイドを分離できるのである。

【0014】以下、本発明の製造方法を具体的に詳述する。

【0015】日本産イチイの樹皮を採取し、アルコールで数回抽出する。アルコールは、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどであるが、メタノールが好ましい。

【0016】ついでその抽出液を活性炭－セライト処理し、濃縮する。ついでその濃縮液を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を重曹水で抽出しカルボン酸区分、希アルカリ（1%以下のKOHあるいはNaOHの食塩半飽和液）で抽出しフェノール区分、希塩酸で抽出しアルカロイド区分と中性区分を分離する。中性区分を活性炭を上層に敷いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付してベンゼン、トルエン、ヘキサン、酢酸エチルなど*

*の有機溶媒を用いて溶出分離することによってタキソールが得られる。また必要に応じて分取薄層クロマトグラフィー（PTLC）などを用いることもできる。

【0017】

【発明の効果】本発明の方法は、イチイ植物体の生原料をも用いることができる。

【0018】また、容易にカルスに誘導できるので組織培養によりタキソールの生産ができる。以下、本発明の製造方法の効果を従来の製造方法と比較し説明する。

【0019】1. 産地による差異

イチイは、本州では亜高山帯に自生するが、北海道では低地でも天然の樹林帯が見られる。宮城県産の普通型イチイにはタキソールが0.012%含まれていた。一方、富山県産高木性のイチイ樹皮にもタキソールは含まれていなかったが、北海道札幌市および岐阜県高山のイチイ樹皮には、それぞれ0.0014%、0.004%のタキソールが含まれていた。

【0020】

【表1】

産地	タキソール含量	
	葉	樹皮
北海道		
札幌市産（高木）	0%	0.0014%
宮城県産（高木）		
仙台市産		
キミノオンコメス株	0.001%	0.012%
富山県産（高木）		
朝日町産メス株	0%	0%
岐阜県産（高木）	0%	0.004%
飛騨高山産		

【0021】（HPLC分析）

Column: Finepak SIL C18-5 (4.6mm×250mm)

溶媒: MeOH:H₂O:CH₃CN (40:82:78)、流量 1.0ml/min

タキソールの保持時間 t_R : 18min, 分析機器 JASCO Tri roter

2. 抽出方法による差異

R. W. Millerら（J. Org. Chem., 第46巻、第1469頁～第1474頁、1981年）はイチイ乾燥粉末のエタノール抽出液を水で希釈し、石油エーテルで洗い油脂区分を除き、クロロホルムで抽出した。抽出液の濃縮物をシリカゲル・カラムクロマトグラ

フィーによりクロロホルム：メタノール（95：5）溶出区分をドロップカウンター・カレント（DCC）による分離操作によりタキソールを分離した。

【0022】本発明の方法は、イチイ植物体の生原料を直接にメタノール抽出（3回）し、濃縮液を酢酸エチルで抽出する。酢酸エチル層を希アルカリ水溶液（1%以下のKOHあるいはNaOHの食塩半飽和液）で数回（3回程度）洗うと、分離操作に支障をきたすフェノール区分をほぼ完全に除くことができる。有機溶媒を留去し、残留物をシリカゲル・クロマトグラフィーによりベンゼン（トルエン、ヘキサン）：酢酸エチル（3：1～

5

1:1)により溶出すると極性の低いタキサンテルペノイドの後、タキソール区分が得られる。

【0023】このように、発明者の方法によりイチイ抽出物から分離操作に支障をきたすフェノール区分を除くと容易にタキソールおよびタキサン・テルペノイド類を分離することができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例および比較例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0025】実施例1

飛騨高山産イチイ(高木)樹皮(1.74kg)をメタノールにて抽出した。

【0026】メタノール抽出液を濃縮し、酢酸エチルに溶かして食塩半飽和の0.5%NaOH水溶液で3回抽出しフェノール区分を除く。酢酸エチル層を更に、5%メタノールを含む5%塩酸水で3回抽出した。希塩酸層を併せてアルカリ性として酢酸エチル抽出するとタキサン・アルカロイド類(350mg)が得られた。

【0027】中性区分400mgをTLCを2回分取操作(ヘキサン:酢酸エチル=1:1、 $R_f=0.12\sim0.17$ 、ヘキサン:酢酸エチル=1:2、 $R_f=0.60\sim0.65$)し、80%メタノールから再結晶化するとタキソール、mp 214~216°C, $[\alpha]_D^{25}-4.5^\circ$ (MeOH), MS m/e 553 (M^+) (約5mg)が得られた。

【0028】またシリカゲルのカラムクロマトグラフィーを用いてベンゼン:酢酸エチル(3:1~1:1)溶出により分離し、メタノールから再結晶するとタキソールがえられた。

【0029】実施例2

富山県産高木イチイの樹皮(2.49kg)をメタノールで抽出し、抽出液を活性炭処理、濃縮した。濃縮液を酢酸エチルにて抽出すると粗抽出物(82.0g)が得られた。粗抽出物(65.0g)の酢酸エチル溶液を食塩半飽和の0.5%NaOH液で洗い(3回)、カルボン酸およびフェノール区分を除き、5%メタノールを含む5%塩酸で3回抽出するとアルカロイド区分(370mg)と中性区分(14.9g)が得られた。中性区分を活性炭を上層したシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼン:酢酸エチル(3:1~1:1)で溶出すると、グリセリド1.721g、タキシニン(m.p. 270~271°C) 582mg、 β -シトステロール730mg、についてタキサンテルペノイド類(630mg)が得られた。

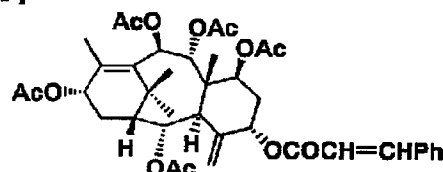
6

【0030】これをTLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:2)で分取すると134mgの4(20), 11-taxadiene-2, 5, 7, 9, 10, 13-hexanol, 5-cinnamoyl, 2, 7, 9, 10, 13-pentaacetate

【0031】

【化1】

10

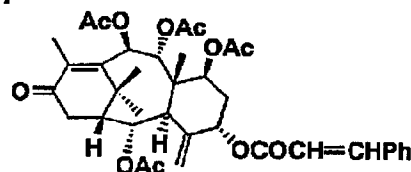


【0032】と少量のタキシニンB(10mg)が得られた。

【0033】

【化2】

20



【0034】m. p. 265~266°C $[\alpha]_D^{25}+3.8^\circ$ (CHCl₃)

さらに、ベンゼン:酢酸エチル(1:1)で溶出しタキソール対応区分を得た。この区分を更にTLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:2)で分取しタキソール R_f 値相当区分(90mg)を得た。

30

【0035】¹H-NMR分析ではタキサン環の存在を示さない芳香族化合物であり、タキソールは含まれていなかった。

【0036】実施例3

キミノオンコ樹皮メス株74.8gのメタノール:クロロホルム(3:1)抽出物からアルカロイド含有中性区分360mgを得た。これを希塩酸で抽出しアルカロイド区分136mgと中性区分200mgを得た。後者をHPLC分析するとタキソール(0.012%含量)が存在した。同株の葉655gのメタノール抽出物からアルカロイド区分757mgと中性区分1.877gを得た。

40

【0037】後者をHPLC分析に供するとタキソール含量は0.0014%であった。

PARTIAL TRANSLATION OF JPP No. 9-40567

Title of the Invention: Method for Producing Taxol and
Taxane Terpenoids
Publication Date: February 10, 1997
Application No. 7-191970
Filing Date: July 27, 1995

[0025]

Example 1

Japanese yew (Takagi) bark (1.74 kg) from Takayama, Hida area was subjected to extraction with methanol.

[0026]

The methanol extract was concentrated, was dissolved in ethyl acetate, and was extracted with a 0.5 % NaOH aqueous solution half-saturated with salt three times to remove a phenol fraction. The ethyl acetate layer was further extracted with a 5% hydrochloric acid aqueous solution containing 5% methanol three times. The dilute hydrochloric acid layer was collected, the pH thereof was adjusted to alkaline, and the layer was subjected to extraction with ethyl acetate to obtain taxane alkaloids (350 mg).

[0027]

400 mg of the neutral fraction was divided into two portion, and each portion was subjected to TLC (hexane:ethyl acetate=1:1, R_f =0.12 to 0.17, hexane:ethyl acetate=1:2, R_f =0.60 to 0.65) and a recrystallization process from 80 % methanol to obtain taxol having a mp of

214 to 216 °C, $[\alpha]_D -45^\circ$ (MeOH) and MS m/e 853 (M^+) (about 5 mg).

[0029]

As an alternative process, the mixture was separated by column chromatography with silica gel eluted with benzene:ethyl acetate (3:1 to 1:1) and was subjected to a recrystallization process to obtain taxol.